

2. 大うつ病障害

大うつ病性障害を対象とする死後脳マイクロアレイ解析研究は筆者が運営に参加した米国のカリフォルニア大学アーバイン校脳バンクの他、先述のスタンレー財団、エール大学、コロンビア大学、カナダのマギル大学等の脳バンクで集積された死後脳を対象として行われている。筆者等のグループは大うつ病性障害罹患者の前頭前野、前帯状回などのアレイ解析を行い GABA 神経伝達^{15, 16)}、グルタミン酸神経伝達¹⁵⁾、繊維芽細胞成長因子システム¹⁷⁾、G 蛋白結合受容体信号伝達システム (投稿中) に関連する遺伝子発現の顕著な変化を観察した。この他、これまでにミエリン¹⁸⁾、ポリアミン代謝^{19, 20)}、細胞増殖^{14, 17, 21)}、細胞代謝^{14, 16)}、ストレス反応²²⁾、転写^{16, 22)} に関する遺伝子群が大うつ病性障害、または、大うつ病性障害に伴う自殺の影響により発現変化を受ける遺伝子群として報告されている。大うつ病性障害の病態特異的な発現変化として報告される遺伝子群が双極性障害以上に論文毎に異なる傾向にあるのは、本質的に大うつ病性障害の成因の異質性が高いと考えられること、準拠する脳バンクの数が多いこと等も要因として考えられるが、必ずしもデータそのものの再現性が低いことを意味するものではなく、ただ単にデータ解析や論文化する際の焦点の当て方が異なる面もあると考えられる。

3. 死後脳研究の今後の課題

死後脳研究には、罹患者の病型、病歴、死亡時の病勢、合併症等の多様性に加え、罹患者、健常者ともに共通する問題として、喫煙、飲酒、薬剤服用歴、死亡時の年齢、死亡時の状況、死後の脳の摘出、保管状況の多様性等の問題が大きいのに対し、各脳バンクで集積しうる症例数の数が現在までのところ少ないことから、今後、交絡因子に関する詳細な情報とともにより多くの死後脳の集積を可能にする脳バンク制度の充実を急ぐ必要がある^{23, 24)}。また、これまでの死後脳研究は主に欧米の脳バンクで集積された白人からの死後脳提供によるものが多く、アジア人、日本人との遺伝学的バックグラウンドの相違を考えると日本独自の脳バンク制度の整備が望まれる。技術的にも今後、次世代シーケンサーが普及し、より詳細かつ多様な遺伝子転写制御に関わる現象の評価が可能になることが期待される。また、脳は様々な種類の神経細胞やグリア細胞の複合体であるがこれまでの研究の多くは組織ブロックから抽出された RNA を解析しており、組織ブロックにおける細胞種の混合比率のばらつきに起因する偽陽性や特定の細胞種で起きている重要な変化が他の細胞種の現象に埋もれて検出されない等の可能性があり、細胞種特異的現象の評価は今後の課題となる。

「末梢血等における遺伝子発現研究」

死後脳研究に比べて末梢血は採取が行い易く、また、同一の罹患者から複数の時点で採血を行うことで病相の影響を直接観察することが可能であることからも有用な研究の対象となる。血液の遺伝子発現解析が精神疾患の病態解明に有用である可能性として (1)脳細胞と血液細胞のゲノム塩基配列はプロモーター等の遺伝子発現調節に関わる領域も含めてほぼ同一であることから、遺伝子発現調節にもある程度相関があると考えられる。(2)脳と末梢組織はある程度同様にストレス、ホルモン、神経調節因子等の暴露を受けると考えられる。(3)モノアミン、サイトカイン等共通の分子が脳内と末梢細胞で重要な働きを持ち、末梢の現象が脳の現象と相関することが報告されている。(4)神経精神免疫相関、すなわち精神活動から免疫細胞への影響、免疫細胞から脳活動への影響がある等のことが考えられる (図1)。血液等を対象とする気分障害の網羅的遺伝子発現研究のこれまでの成果と今後の課題を下記に概説する。

1. 双極性障害

双極性障害における末梢血由来細胞の網羅的遺伝子発現解析を行った研究として統合失調症、双極性障害と健常者の全血をアレイ解析し、APOBEC3B、ADSS、ATM、CLC、CTBP1、DATF1、CXCL1、S100A9の8つの遺伝子発現パターンにより統合失調症と双極性障害を鑑別出来る可能性を示唆する報告や²⁵⁾、躁・うつ病相が短期間のうちに交代する急速交代型双極性障害罹患者の躁病相時とうつ病相時に複数回採血して単核球層をアレイ解析し、うつ病相時にプロスタグランジン関連遺伝子PTGDSとAKR1C3の発現の上昇を認めた報告がある²⁶⁾。また、双極性障害罹患者と健常者由来のリンパ球を5日間低糖条件下培養する前後でアレイ解析を行い、低糖培養後のリンパ球中のミトコンドリア電子伝達系遺伝子発現は健常者では上昇するのに対し罹患者では低下するという報告もある²⁷⁾。

双極性障害罹患に関して不一致 (一人が双極性障害に罹患し、もう一人が健常) である一卵性双生児同胞から樹立したBリンパ芽球培養細胞のアレイ解析を行いXBP1等の発現変化を報告した研究は注目を集め²⁸⁾、その後、XBP1の機能解析や双極性障害との相関研究など様々な方向からの研究が行われている²⁹⁻³²⁾。一方、別のグループが同様に双極性障害罹患に関して不一致の一卵性双生児のBリンパ芽球のアレイ解析を行った研究ではXBP1の発現変化は追認できず、WNTシグナルやアポトーシスに関連する遺伝子発現が上昇していた³³⁾。また、双極性障害群と健常者群由来のBリンパ芽球培養細胞の発現変化を比較した研究として、ミトコンドリア関連遺伝子NDUFV2の発現変化を認めた報告³⁴⁾やBリンパ芽球のアレイデータと死後脳のアレイデータを統合し、LIMとHSPF1を双極性障害の病態に関連して死後脳とリンパ芽球とに共通に発現調節を受ける遺伝子として特定した報告がある⁹⁾。

末梢血に比べ採取が困難であるが、より中枢神経系に近い発現プロファイルを持つと考えられる嗅上皮細胞を双極性障害罹患者と健常者から採取してアレイ解析を行った報告

があり、双極性障害罹患者の嗅上皮細胞では細胞死が多く見られ、フォスファチジルイノシトール信号伝達系関連の遺伝子発現の発現変化が認められている³⁵⁾。

2. 大うつ病障害

大うつ病性障害の末梢血を対象とする網羅的遺伝子発現解析研究としては、抑うつ状態の罹患者のリンパ球にセロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害剤である抗うつ剤ベンラファキシンを投与したものと非投与の細胞をアレイ解析し、イオンホメオスタシス、細胞生存、神経可塑性、信号伝達等に関する遺伝子発現を観察した報告や³⁶⁾、大うつ病性障害罹患者と健常者の血液を多数のストレス関連遺伝子に特異的なプローブを載せたカスタムアレイで解析し、十数種の遺伝子の発現変化を観察したとする報告³⁷⁾等がある程度である。

3. 末梢血研究の今後の課題

気分障害の成因解明のための末梢血を対象とする網羅的発現解析研究は端緒についたところで、現在のところ再現性の高い知見が得られるに至っていない。これまで末梢血を対象として行われている研究は新鮮血からの全血、単核球層、またはリンパ球を対象とするものか、Bリンパ芽球培養細胞を対象とするものである。Bリンパ芽球培養細胞はEBウイルスがホストのゲノムDNAに挿入されることでリンパ球を株化細胞に形質転換させるが、この工程がランダムに発現調節に影響を及ぼす可能性が考えられる。新鮮血の場合、全血、単核球層はいうに及ばず、リンパ球にしてもB細胞、T細胞、NK細胞、更に様々な性格・機能をもつそれぞれのサブクラスの免疫細胞を含んでおり、死後脳組織ブロックの解析と同様、細胞種の混合の比率のばらつきに起因する偽陽性や、特定の細胞種で起きている重要な変化が他の細胞種の減少に埋もれて検出されない可能性があり、細胞種特異的な解析が必要と考えられる。これらの課題を解決する方法として筆者らはセルソーターを用いて新鮮血からTh1やTh2ヘルパーT細胞分画や単球などの特定の免疫細胞を単離してアレイ解析を行う技法を確立し、精神疾患の成因解明のため応用している。

「おわりに」

気分障害の病態解明に向けて死後脳、末梢血を対象に網羅的遺伝子発現解析研究が複数の研究グループで行われ一定の成果は上がっているが今後の課題は多い。死後脳研究に関しては、今後、より多くの検体を用いて、より有効に交絡因子を考慮に入れた解析を行うことを可能にするような研究体制の拡充が望まれる。欧米の既存の脳バンクは症例数の集積に向けて活発に活動しており、更に新たな脳バンクが欧米やアジア諸国で新設されてきている。日本でも死後脳バンク体制構築の必要性についての認識が広まり、日本生物学的精神医学会にブレインバンク設立委員会が設けられる等、複数の施設で連携して倫理的にも技術的にも信頼に足る死後脳バンクの制度を構築する準備が進んで来ており、今後の

本邦における死後脳研究の発展が期待される。末梢血を対象とする精神疾患の分子遺伝学的研究もまだ端緒にいたところで、今後、より多くの症例を対象に細胞種や表現型を絞り込んだ研究がなされることで有益な知見が集積されることが期待される。

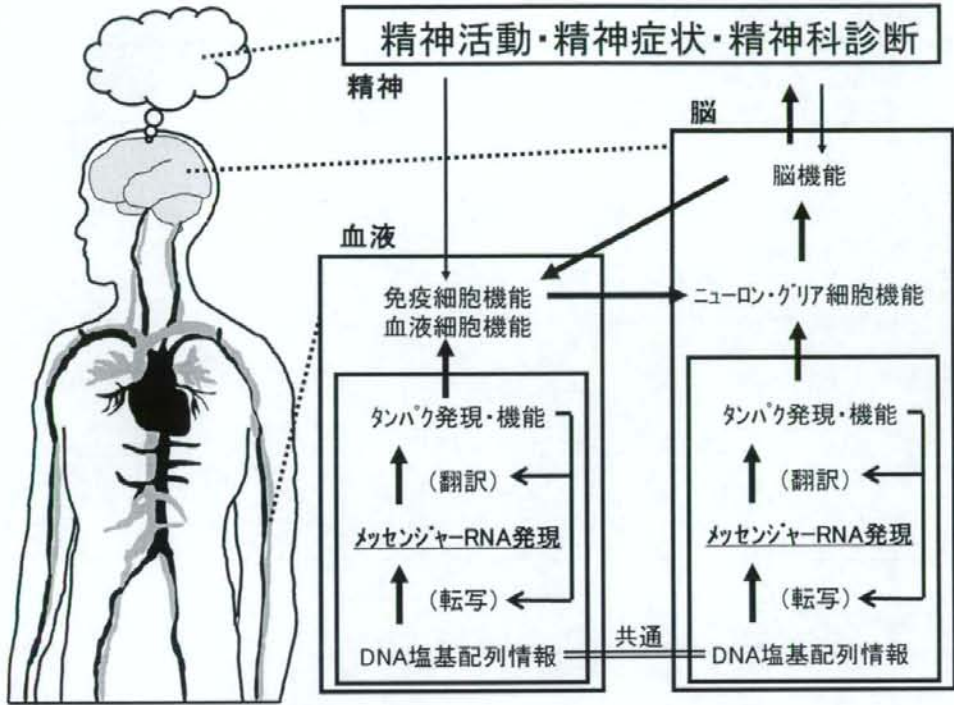
文献

- 1) Tkachev, D., et al.: Oligodendrocyte dysfunction in schizophrenia and bipolar disorder. *Lancet/Lancet*, **362**: 798-805, 2003.
- 2) Sokolov, B. P.: Oligodendroglial abnormalities in schizophrenia, mood disorders and substance abuse. Comorbidity, shared traits, or molecular phenocopies? *Int J Neuropsychopharmacol/Int J Neuropsychopharmacol*, **10**: 547-555, 2007.
- 3) MacDonald, M. L., et al.: Decrease in creatine kinase messenger RNA expression in the hippocampus and dorsolateral prefrontal cortex in bipolar disorder. *Bipolar Disord/Bipolar Disord*, **8**: 255-264, 2006.
- 4) Iwamoto, K., et al.: Altered expression of mitochondria-related genes in postmortem brains of patients with bipolar disorder or schizophrenia, as revealed by large-scale DNA microarray analysis. *Hum Mol Genet/Hum Mol Genet*, **14**: 241-253, 2005.
- 5) Quiroz, J. A., et al.: Mitochondrially mediated plasticity in the pathophysiology and treatment of bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology/Neuropsychopharmacology*, **33**: 2551-2565, 2008.
- 6) Sun, X., et al.: Downregulation in components of the mitochondrial electron transport chain in the postmortem frontal cortex of subjects with bipolar disorder. *J Psychiatry Neurosci/J Psychiatry Neurosci*, **31**: 189-196, 2006.
- 7) Kato, T., et al.: Comprehensive gene expression analysis in bipolar disorder. *Can J Psychiatry/Can J Psychiatry*, **52**: 763-771, 2007.
- 8) Vawter, M. P., et al.: Mitochondrial-related gene expression changes are sensitive to agonal-pH state: implications for brain disorders. *Mol Psychiatry/Mol Psychiatry*, **11**: 615, 663-679, 2006.
- 9) Iwamoto, K., et al.: Molecular characterization of bipolar disorder by comparing gene expression profiles of postmortem brains of major mental disorders. *Mol Psychiatry/Mol Psychiatry*, **9**: 406-416, 2004.
- 10) Ryan, M. M., et al.: Gene expression analysis of bipolar disorder reveals downregulation of the ubiquitin cycle and alterations in synaptic genes. *Mol Psychiatry/Mol Psychiatry*, **11**: 965-978, 2006.
- 11) Bezchlibnyk, Y. B., et al.: Decreased expression of insulin-like growth factor binding protein 2 in the prefrontal cortex of subjects with bipolar disorder and its regulation by lithium treatment. *Brain Res/Brain Res*, **1147**: 213-217, 2007.

- 12) Elashoff, M., et al.: Meta-analysis of 12 genomic studies in bipolar disorder. *J Mol Neurosci/J Mol Neurosci*, **31**: 221-243, 2007.
- 13) Kim, S., et al.: Suicide candidate genes associated with bipolar disorder and schizophrenia: an exploratory gene expression profiling analysis of post-mortem prefrontal cortex. *BMC Genomics/BMC Genomics*, **8**: 413, 2007.
- 14) Kim, S. and Webster, M. J.: Correlation analysis between genome-wide expression profiles and cytoarchitectural abnormalities in the prefrontal cortex of psychiatric disorders. *Mol Psychiatry/Mol Psychiatry*, 2008.
- 15) Choudary, P. V., et al.: Altered cortical glutamatergic and GABAergic signal transmission with glial involvement in depression. *Proc Natl Acad Sci U S A/Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**: 15653-15658, 2005.
- 16) Sequeira, A., et al.: Patterns of gene expression in the limbic system of suicides with and without major depression. *Mol Psychiatry/Mol Psychiatry*, **12**: 640-655, 2007.
- 17) Evans, S. J., et al.: Dysregulation of the fibroblast growth factor system in major depression. *Proc Natl Acad Sci U S A/Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**: 15506-15511, 2004.
- 18) Aston, C., et al.: Transcriptional profiling reveals evidence for signaling and oligodendroglial abnormalities in the temporal cortex from patients with major depressive disorder. *Mol Psychiatry/Mol Psychiatry*, 2004.
- 19) Klempan, T. A., et al.: Profiling brain expression of the spermidine/spermine N(1)-acetyltransferase 1 (SAT1) gene in suicide. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet/Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2009.
- 20) Sequeira, A., et al.: Implication of SSAT by gene expression and genetic variation in suicide and major depression. *Arch Gen Psychiatry/Arch Gen Psychiatry*, **63**: 35-48, 2006.
- 21) Tochigi, M., et al.: Gene expression profiling of major depression and suicide in the prefrontal cortex of postmortem brains. *Neurosci Res/Neurosci Res*, **60**: 184-191, 2008.
- 22) Kang, H. J., et al.: Gene expression profiling in postmortem prefrontal cortex of major depressive disorder. *J Neurosci/J Neurosci*, **27**: 13329-13340, 2007.
- 23) Tomita, H., et al.: Effect of agonal and postmortem factors on gene expression profile: quality control in microarray analyses of postmortem human brain. *Biol Psychiatry/Biol Psychiatry*, **55**: 346-352, 2004.
- 24) 富田博秋: 【DNA マイクロアレイと脳バンク】 死後脳組織を対象とした分子遺伝学的研究の実際. *分子精神医学/分子精神医学*, **6**: 243-250, 2006.
- 25) Tsuang, M. T., et al.: Assessing the validity of blood-based gene expression profiles for the classification of schizophrenia and bipolar disorder: a preliminary report. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet/Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, **133B**: 1-5, 2005.
- 26) Begemann, M., et al.: Episode-specific differential gene expression of peripheral blood

- mononuclear cells in rapid cycling supports novel treatment approaches. *Mol Med/Mol Med*, **14**: 546-552, 2008.
- 27) Naydenov, A. V., et al.: Differences in lymphocyte electron transport gene expression levels between subjects with bipolar disorder and normal controls in response to glucose deprivation stress. *Arch Gen Psychiatry/Arch Gen Psychiatry*, **64**: 555-564, 2007.
- 28) Kakiuchi, C., et al.: Impaired feedback regulation of XBP1 as a genetic risk factor for bipolar disorder. *Nat Genet/Nat Genet*, **35**: 171-175, 2003.
- 29) Kakiuchi, C., et al.: XBP1 induces WFS1 through an endoplasmic reticulum stress response element-like motif in SH-SY5Y cells. *J Neurochem/J Neurochem*, **97**: 545-555, 2006.
- 30) Hayashi, A., et al.: Aberrant endoplasmic reticulum stress response in lymphoblastoid cells from patients with bipolar disorder. *Int J Neuropsychopharmacol/Int J Neuropsychopharmacol*, **12**: 33-43, 2009.
- 31) Cichon, S., et al.: Lack of support for a genetic association of the XBP1 promoter polymorphism with bipolar disorder in probands of European origin. *Nat Genet/Nat Genet*, **36**: 783-784; author reply 784-785, 2004.
- 32) Chen, W., et al.: A case-control study provides evidence of association for a functional polymorphism -197C/G in XBP1 to schizophrenia and suggests a sex-dependent effect. *Biochem Biophys Res Commun/Biochem Biophys Res Commun*, **319**: 866-870, 2004.
- 33) Matigian, N., et al.: Expression profiling in monozygotic twins discordant for bipolar disorder reveals dysregulation of the WNT signalling pathway. *Mol Psychiatry/Mol Psychiatry*, **12**: 815-825, 2007.
- 34) Washizuka, S., et al.: Expression of mitochondria-related genes in lymphoblastoid cells from patients with bipolar disorder. *Bipolar Disord/Bipolar Disord*, **7**: 146-152, 2005.
- 35) McCurdy, R. D., et al.: Cell cycle alterations in biopsied olfactory neuroepithelium in schizophrenia and bipolar I disorder using cell culture and gene expression analyses. *Schizophr Res/Schizophr Res*, **82**: 163-173, 2006.
- 36) Kalman, J., et al.: Impact of venlafaxine on gene expression profile in lymphocytes of the elderly with major depression--evolution of antidepressants and the role of the "neuro-immune" system. *Neurochem Res/Neurochem Res*, **30**: 1429-1438, 2005.
- 37) Ohmori, T., et al.: Assessment of human stress and depression by DNA microarray analysis. *J Med Invest/J Med Invest*, **52 Suppl**: 266-271, 2005.

図1



特集：精神疾患のブレインバンク設立に向けて

17-24

交絡因子に配慮した脳バンク構築の必要性

富田 博秋*, 田中 千晶*, 兪 志前*

Key words : brain bank, postmortem brain, agonal state, tissue pH, RNA integrity, microarray

1. はじめに

多数の遺伝子発現量などの分子遺伝学的現象を一度に包括的に解析するハイスループット解析技術は急速な進歩を遂げてきており、これらの技術を用いて精神疾患罹患者と健常対象者の死後脳を解析し比較することで、精神疾患の病態に関連する分子遺伝学的現象を特定できる可能性が広がってきている。このような研究の必要性から、欧米を中心として世界的に脳バンクの設立が加速しているが、現在のところ、分子遺伝学的研究の対象とするに足る検体数の死後脳を集積している脳バンクは欧米に偏在し、このため、ほとんどの死後脳研究は白人の脳に基づくものになっている。遺伝的バックグラウンドの相違を考えると、日本人あるいはアジア人を対象とする死後脳研究は日本やアジア諸国の精神疾患罹患者の分子病態を解明する上で重要なことである。日本においても死後脳研究の重要性や脳バンクの必要性については年々多くの精神科医や神経科学者の関心を引くようになってきており、日本のより多くの施設において脳バンクを設立・拡充させ、また、互いに有効に連携を取る体制を模索するための試みが始まって

いる。日本は欧米に比べると一足遅れて精神疾患の分子遺伝学的研究に備えた脳バンクの整備に着手することになる訳だが、その分、欧米でのこれまでの取り組みから得られた知見・ノウハウから、効率的で有用な脳バンク運営や死後脳研究の方法を学べるという利点がある。

そのような知見の中でも最も注目すべきことのひとつに死後脳の分子遺伝学的状態から疾患病態の因子を特定する上で、病態以外の諸条件に由来する交絡因子の評価・コントロールの問題がある。解析の対象となる死後脳の分子遺伝学的状態は単に精神疾患に罹患していたか否かという均一な疾患病態に由来する因子のみを反映するものではない。精神疾患罹患者の病歴、治療歴、死亡時の病勢は多様であり、また、罹患者、対照者の死後脳の分子遺伝学的状態は、精神疾患の病態という要因と同時に、性差や飲酒、喫煙歴など様々な生前の環境、死亡年齢、死因、死亡時の状況および死後の脳の摘出や保管の条件などの様々な要因を反映する。これらの要因は、死後脳研究により病態による因子を特定する際の交絡因子となり、交絡因子の評価・コントロールを如何に行うかが、死後脳研究により病態解明の有効性、信頼性を高める鍵となる。本稿では、脳バンク運営にお

Control of Confounding Factors in Brain Bank Management

* 東北大学大学院医学系研究科精神・神経生物学分野 [〒980-8574 仙台市青葉区星陵町1-1] Hiroaki Tomita, Chiaki Tanaka, Zhiqian Yu : Department of Biological Psychiatry, Tohoku University Graduate School of Medicine, 1-1 Seiryomachi, Aoba-ku, Sendai 980-8574, Japan.

【富田博秋 E-mail : htomita@mail.tains.tohoku.ac.jp】

ける技術的側面の重要事項となる交絡因子の評価とコントロールに関して考慮すべき案件について検討を行う。

なお、欧米ではこれらの問題は、脳組織の Quality Control (品質管理) の問題と総称されることが多く、2008 年の生物学的精神医学会のシンポジウムで筆者は「品質管理に配慮した脳バンク構築の必要性」というタイトルを用いた。ここで Quality (品質) と呼ばれ問題となるものは、主に組織の保存状態、分子の Integrity (安定性) などの問題であり、解析により疾患の病態の影響を評価できる状態であるか否かという意味で High Quality (高品質)・Poor Quality (低品質) という言葉が用いられている。しかし、これを直訳して、日本において、「品質管理」「高品質」「低品質」という言葉を用いると、「品質」という言葉が生前の脳機能などその他の属性に関することなどを誤って連想させたり、脳の物質的な面が強調されて、脳組織に対する尊敬の念を関係者・協力者・市民の間で共有する上で望ましくないと考えるに至った。そこで、「品質」という訳語を用いることを避けて、この問題に関して、評価・コントロールの対象を端的に示す「Confounding factor (交絡因子)」という言葉を用いて、この問題を交絡因子の評価・コントロールの問題として検討・記載を行いたい。

2. 死後脳研究における交絡因子

一般に精神疾患の死後脳研究の主な目的は死後脳の組織・細胞・分子の状態を解析することで生前の精神疾患の病態が脳の組織・細胞・分子に及ぼした影響を特定することであると考えられるが、その際の交絡因子となる要因の概要を図 1 に示す。精神疾患罹患者に特有の生前の因子として、疾患の病型、臨床症状、病歴、発症してからの経過の長さ、死亡時の病勢、治療歴、既往歴、身体合併症などの要因は、疾患の病因・病態との関連や、これらの因子間の相互の関連について検討されなければならない。また、罹患者、対照者ともに共通する生前の因子として、性差や飲酒、喫煙歴など様々な生前の生活環境からくる要因も、死

後脳の分子遺伝学的状態に反映されることが知られている。また、死亡時の年齢、死因も死後脳の状態に影響する重要な要因となる。死亡に直結する病態の始まりから死亡に至るまでの期間で、生命をかりうじて維持する程度の循環動態が保たれているものの脳などの重要臓器の機能を維持するには不十分な状態を死戦期状態 (Agonal State) と呼ぶが、死戦期に起こる脳内の分子現象の変化は、そのまま直接死後脳の分子遺伝学的状態として残るため、死戦期の因子 (Agonal Factor) は特に重要である。死後、脳が摘出、保管され解析されるまでの課程も交絡因子として検討される必要がある。死亡した時点から、脳が摘出され、冷凍庫に凍結されるまでの時間は一般に死後経過時間 (Postmortem Interval: PMI)、凍結後、解析に使用されるまで冷凍庫に保管される期間を冷凍保存期間 (Freezer Storage Time) と呼ばれ、死後脳研究に特有な交絡因子として重視される。

これまでの研究から、上記の生前、死戦期、死後の因子は脳組織の性状に特異的な影響を及ぼすことが知られ、脳組織の性状を調べることである程度客観的に評価できることがわかってきた。死戦期に長時間に渡って低酸素等の状況に暴露されることなどにより死後脳組織の pH が低下するとともに RNA 退縮が進んで RNA の完全性 (integrity) が低下することに関しては従来より多数の報告がこれを裏付けており^{1) 2) 6) 7) 11) 12) 15) 18) 21) 23) 25) 27) 35)}、近年のマイクロアレイを用いた発現プロファイルによる評価でもこれらの因子の顕著な影響が複数の研究グループにより観察されている^{11) 15) 19) 20) 28) 31) 32) 34)}。一方、死戦期の状況を客観的に評価することの困難さを指摘する論文³⁴⁾や死戦期の状況と RNA 完全性の相関を否定する研究^{9) 26)}もあるが、そのようなグループも RNA 完全性は重要な交絡因子としてコントロールされる必要があると結論づけている。客観的記録として特定可能な死戦期の影響、組織 pH と RNA の完全性などは死後脳研究においてコントロールを行うべき客観的な交絡因子として重要であることはコンセンサスのあるところと考えられる。また、死戦期状態や死後経過時間は特定の遺伝子の発現量に反映されるといふ報告もあり^{13) 17) 22) 24) 30)}、死戦期や死後経過時間に発現

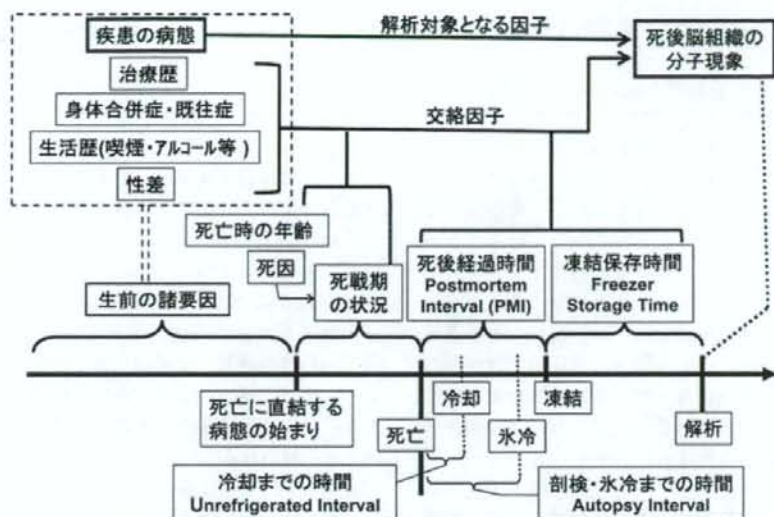


図1 死後脳を対象とする分子遺伝学的研究における交絡因子

が相関する遺伝子の発現レベルも客観的な交絡因子として使用しうる。また、あらゆる実験に共通することであるが、様々な解析の際のアーチファクトも交絡因子として注意を払う必要がある。以下の項では、臨床症状と死後脳を集積する上で、死後脳の交絡因子に関して配慮すべき点を検討する。

3. 臨床情報の集積と交絡因子の評価

精神疾患罹患者の診断、病歴、治療歴、死亡時の病勢、合併症などを正確に判断するために、適宜、遺族、主治医へのインタビュー、カルテの確認、剖検時の所見などの情報を集積し、これらの情報を総合して行われる。健常対照者についても見逃されている精神疾患既往歴がないかを慎重に調査する必要がある。また、罹患者、対照者とも、性差や飲酒、喫煙歴など、様々な生前の環境の相違、死亡時の年齢、死因、死亡前後の状況は分子の発現状況に影響することが知られ評価を要する。特に死亡前一定期間、低酸素状態、昏睡、発熱、痙攣、脱水、低血糖、頭部外傷(特に開放性)、

神経毒性物質の摂取、腎不全や多臓器不全などのエピソードがあり、徐々に衰弱して死去した場合、そのような死亡時の状況は、あらゆる要因の中でも多大に脳の mRNA やタンパク質の発現や安定性に作用することが知られ、この影響は精神疾患の及ぼす影響よりもはるかに大きいと考えられるので、この要因を十分に評価し影響を最小限にコントロールすることは重要である³⁰⁾。死戦期の影響の大きい症例や組織 pH が著しく低下している脳組織は解析の対象から除外することが望ましいと考えられる^{16) 30)}。

死戦期の影響に比べるとその他の交絡因子の影響は比較的小さいと考えられるが、性差、死亡時の年齢、服薬歴、喫煙歴なども死後脳の分子遺伝学的状態への影響が報告されており、このうち、服薬歴、喫煙歴は組織 pH に影響することも示唆されている^{1) 10) 20) 23)}。これらの因子の影響は死戦期の影響ほどは大きくないと考えられることや、集積しうる症例数に制限があることから、抗精神病薬の未服薬症例や非喫煙例症例だけの解析を行うことを考えるのは現実的ではない。これらの因子は、統計解析の際にこれらの因子を交絡因子と

して注意深く取り扱うことが重要と考えられる。

4. 死後脳集積と交絡因子の評価

米国の脳バンクは検死官事務所 Coroner's Office と連携し、検死を受ける遺族から脳バンク運営の目的・方法などを理解した上で死後脳の寄付について同意を得ることに基づいていることが多い。検死官事務所の多くでは遺体が搬入されてから検死解剖までの間、4℃の部屋に遺体を安置する。検死官事務所に詰めている脳バンクの専属スタッフが遺族に連絡を取り、遺族の同意が得られ脳が摘出された場合、摘出された脳は水上に置かれて神経病理医の所まで搬送され、神経病理医が脳を規定の幅の冠状断にスライスし、約-84℃のアルミニウム・プレートで急速冷凍する。スライスされた脳組織ブロック（スラブ：slab）は神経病理医が神経学的病変の有無を確認する必要がある。スラブの両面を写真撮影し保存しておくことも望ましい。亡くなってから脳を凍結するまでの時間は死後経過時間（Postmortem Interval：PMI）として、分子発現状況への影響を評価する必要がある。PMIは48時間を超すとRNA退縮などへの影響が大きいが、それ以内ではそう大きな影響はないとする報告が多い。死後経過時間だけでなく死後から脳組織の冷凍庫への保管の課程を更に細かく分けて、死亡してから4℃の部屋に安置されるまでの時間（Unrefrigerated Interval）、あるいは、死亡してから脳が摘出され水上で冷却されるまでの時間（Autopsy Interval）を、評価の対象にしている脳バンクも多く、特に4℃の部屋に安置されるまでの時間が短いことは交絡因子のコントロールに重要とする知見もある³⁰。

凍結された脳は-80℃の冷凍庫に保存するが、長期にわたって貴重な脳を保存する上で、停電などのトラブルによる温度上昇時に液体窒素が流入し温度を保つ装置や異常時に電話で責任者を呼び出すシステムを装着すること、トラブル発生時に組織を一時的に保管できる予備の冷凍庫スペースが必要である。凍結保存期間中に冷凍庫にトラブルがなければ大きな影響はないとする報告が多いが、PMIなどの因子とともに脳バンクごとに評価

を行う必要がある。また、冷凍保存したスラブの一部をホモジナイズして組織のpHを定量したり、RNAを抽出してRNAの完全性をチェックしておくことが望ましい^{31,32}。

スラブから研究対象となる組織を切り出す際に正確に同じ部位を切り出すことは重要な課題である。たとえば皮質灰白質を解析するのであれば丁寧に白質を取り除くなどの作業が必要になる。対象間で切り出しの際に含まれる組織・細胞の構成のばらつきの問題を解消するためレーザー・マイクロディセクション（Laser Microdissection）技術を用いて組織切片から均一な細胞群を打ち抜いて得た少量のRNAを増幅したサンプルを用いて遺伝子発現を評価することも今後盛んになると思われる^{31,32}。

組織pHの測定は脳組織塊の表面を計る方法もあるが、同一部位から切り出した小切片をホモジナイズしたもののpHを測定する方法が一般的に用いられている。脳部位、ホモジナイズの条件、測定までに要する時間、室温などにより若干pHが異なるため、脳バンク間で共通のプロトコルを使用することが望ましく、少なくとも脳バンクごとには一定の条件で測定が行われる必要がある^{31,32}。複数の研究から死後脳組織の分子遺伝学的状態に顕著な影響を引き起こしうるpHのcut-off値としてpH6.5前後が提唱されている^{9,10,16,25}。もちろんcut-off値は高いほどよいと考えられるが、検体数とpHの影響の程度を兼ね合いで現実的なcut-off値の設定がなされる必要がある。pH6.5以下の組織を含む解析では大多数の遺伝子の発現レベルが組織pHと高く相関し、pHの遺伝子発現プロフィールに及ぼす影響が他の因子に比べて顕著に大きいに対し、pH6.5以上の組織のみでの解析を行うとpHの影響は他の因子と同等のレベルに弱まる。

RNA完全性の評価は組織RNAの中で最も発現量の多いリボソームRNAの28Sと2番目に多い18S分子の発現量を定量することが一般的に行われる。図2に示す通り、28Sは生理的には18Sの倍近く発現しているが、mRNAも含めRNAが退縮するときには分子量の大きい28Sの方がその影響を受けやすいため、28S/18S比をとるとRNA

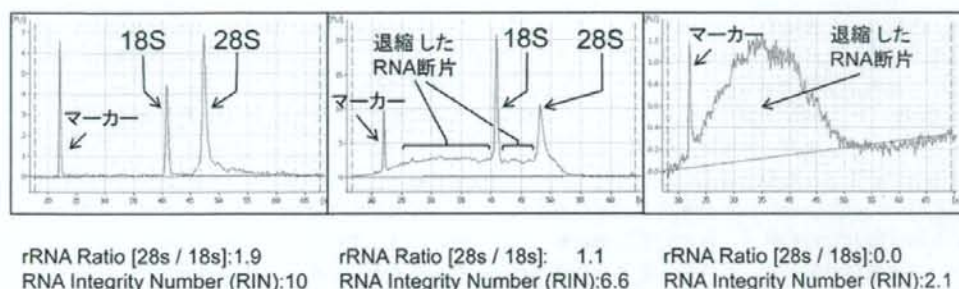


図2 アジレント社バイオアナライザー 2100による18Sと28Sリボソームのピークの抽出

サンプル全体が退縮している程28S/18S比は小さくなっていく。28S/18S比の死後脳研究での現実的な値として1.5程度はあることが望ましいと考えられる。28S、18S発現量の評価はアガロース・ゲルでの電気泳動やアジレント社のバイオアナライザー 2100などにより行われる。バイオアナライザー 2100を用いると28Sと18Sのピークに加え、ベースラインの状態も含めてRNA退縮を評価する指標RNA integrity number (RIN)という指標が算出され、より信頼性の高い指標として広く用いられてきている²⁰⁾。RIN値は10を最高にRNAが退縮するに従い値が低くなる(図2)。この他に、RNA完全性の評価の指標としてRQS (RNA quality scale)も提唱されている⁹⁾。この他、遺伝子転写物の5'端(転写開始部位近傍)上流領域の方は3'端(多重アデニン付着部位近傍)下流領域よりも早く退縮するため、特定の遺伝子の各々の部位に設計されたプライマーを用いてqRT-PCRなどでサンプル中に残存する転写物の5'部位と3'部位のコピー数を定量し、3'/5'比を算出することも可能である^{21) 22)}。

死亡時の状況、組織pH、RNA完全性の評価をマイクロアレイなどの本実験を行う前に行うことが重要であることは言うまでもないが、マイクロアレイ実験を行った場合、そこから得られる豊富なデータは、死亡時の状況、組織pH、RNA完全性を評価する上でも有用である。また、マイクロアレイ実験中の人為的過誤、スキャンする際の気泡やアラインメントのずれなどのアーチファクト

の評価を行う上でも、実験後に実験データそのものを用いて病態解析の上での交絡因子を評価することも重要である。アフィメトリックス社のジーンチップを用いた場合、同社のRPTファイルやバイオコンダクターから無料で提供されるデグラデーション・プロット (AffyRNAdeg: <http://rss.acs.unt.edu/Rdoc/library/affy/html/AffyRNAdeg.html>)を用いてRNA完全性の評価が可能である。またマイクロアレイ機器の種類を問わず、クラスタリング解析、Dispersion Tree解析、平均相関係数解析 (Average Correlation Index: ACI)を用いると死亡時の状況、組織pH、RNA退縮の影響を大きく受けているサンプルやマイクロアレイ実験中に大きな人為的過誤が生じたアレイを手早く確認できる^{19) 20) 23)}。これらの解析をもとに、マイクロアレイデータにより組織pH低下やRNA退縮は遺伝子発現プロファイルに大きな影響を与えるという報告が多くなされている。

今後、死戦期状況、低酸素暴露、pH低下に敏感に反応して発現変化する遺伝子群や死後経過時間の延長に反応して発現変化する遺伝子群が特定され、これらの情報を元にした交絡因子のコントロール方法などが開発されることが望まれる。

5. 交絡因子から見た死後脳バンクの運営形態

従来、日本での死後脳研究における脳組織の集積は、大学病院や研究機関と協力関係にある病院で死亡した罹患者のうち、その遺族が研究の目

的・方法などを理解した上で医学研究のために脳を寄付することに同意した症例を対象に行われるという流れが主流であるのに対し、先述の通り、米国の多くの脳バンク運営や死後脳を対象とする研究における脳組織の集積は、検死のため検死官事務所に搬入された罹患者または健常対照者のうち、遺族の同意を得られたケースを対象に行われるという流れで行われる。検死官事務所に脳バンクの専属職員が常駐し、研究の対象となりうる精神疾患罹患者および健常対照者を選別し、遺族に電話などで研究の目的・方法などの概要を説明し、脳を寄付し生前の情報を収集して研究に用いることに協力が得られるかを打診し、協力への同意が得られた親族に研究の詳細を説明して文書で同意を得るといった流れをとるところが多い。これらの作業は臓器移植のコーディネーターや角膜バンクとも連携しながら行われる。同意の得られた寄付者の脳は摘出された後、匿名化のための番号が付される。それ以降の行程に関わる脳バンク職員や研究者にはこの番号のみが知らされることで、脳組織や臨床データを用いた研究に携わるものに個人情報漏洩しないよう配慮される。脳バンク専属の複数の心理士が適宜精神科医のアドバイスを得ながら、生前の臨床症状や生活歴、死亡時の状況などの情報は遺族、主治医へのインタビュー、カルテの確認、剖検時の所見などを集積、総合して、生前の臨床診断や病状の評価を行い、健常対照者に精神疾患の既往が無いことを確認する。この過程は心理学的剖検 (Psychological Autopsy) という言葉で表現される。これらの手順は事前に十分な法的な検討がなされ施設の倫理委員会が厳正な審査を受け承認を得た上で実施される。

欧米の脳バンクが検死官事務所と連携するシステムであることから、結果として、遺族の同意の元に脳バンクに献体される症例は事故または急性病変が死因となって死亡することが多くなり、このため、先述の死戦期状況の影響が少ないケースが摘出・保管の対象となることが多い。近年では、長時間の死戦期を経たケースを研究あるいは集積・保管の対象から除外する脳バンクも出てきている。また、健常対照者も精神疾患罹患者も検死

の対象となる場合には同様に協力の依頼を行うため、罹患者からの献体と同数以上の健常対照者からの献体が同じ条件で集積されるため、このことは、罹患者と健常対照者を比較し易い条件に結びついている。これに対し、従来の日本の死後臓器を対象とする医学研究は長期の闘病の末に亡くなり、医療機関と遺族の間に既に形成された信頼関係にもとづく同意に伴う臓器提供であることが多く、結果として死戦期状況の影響が大きい症例が集積され易くなることになる。また、健常対照者の死後脳を集積することが困難で、罹患者と健常対照者が異なる施設、システムで集積されることも多くなりがちであり、罹患者と健常者との比較を困難にしている。

このような状況を考慮して、短期・中期的には現在の日本の死後脳集積システムの中で、死後脳研究における交絡因子への対処法を検討する必要がある。また、中長期的には、今後、日本の文化・条件を考慮しながら、より有効に交絡因子の影響を大きく受けずに、精神疾患罹患者と健常対照者の死後脳を解析・比較できるような新しい死後脳集積のシステムを構築していくことが望ましい。そのためにも、当事者・家族を含め社会全体の脳バンクへの理解・関心が高まり、治療を受ける医療機関と遺族の間の信頼関係を越えて、社会と脳バンクの間の信頼関係が形成される必要がある。精神医療・福祉の環境改善を図る上での脳科学推進の重要性と、その一環としての脳バンクの意義・有用性を当事者・家族・市民が理解できるような情報の普及に取り組むことが重要と思われる。

6. おわりに

今後、倫理面、技術面に十分配慮した脳バンクのネットワークが構築され、より多くの対象を均一な条件で解析することができれば、病態解明につながる信頼性の高い解析が可能になり、将来罹患者の方々に還元しうる成果が得られるのではないかと期待される。当面は日本の実情にあった脳バンクの運営システムと交絡因子の評価・コントロールの方法が工夫・検討される必要があると考

えられる。並行して、精神疾患罹患者・家族・市民と医学研究者が、研究により病態の解明が進み、より良い治療法が開発され得るというヴィジョンを共有でき、社会に脳バンク設立・拡充を後押しする機運が高まるよう、研究者側から働きかけることも重要な課題と考えられる。

文 献

- 1) Bahn S, Augood SJ, Ryan M, et al (2001) Gene expression profiling in the post-mortem human brain--no cause for dismay. *J Chem Neuroanat*, 22 : 79-94
- 2) Benfenati F, Cimino M, Zoli M, et al (1991) Decrease in mRNA levels but not in the density of D2 dopamine receptors in rat striatum after transient forebrain ischemia. *Neurosci Lett*, 126: 6-8
- 3) Bernard R, Kerman IA, Meng F, et al (2008) Gene expression profiling of neurochemically defined regions of the human brain by in situ hybridization-guided laser capture microdissection. *J Neurosci Methods*.
- 4) Bonneuil N (2007) Ageing laws for the human frontal cortex. *Ann Hum Biol*, 34 : 484-492
- 5) Bunney WE, Bunney BG, Vawter MP, et al (2003) Microarray technology: a review of new strategies to discover candidate vulnerability genes in psychiatric disorders. *Am J Psychiatry*, 160: 657-666
- 6) Burke WJ, O'Malley KL, Chung HD, et al (1991) Effect of pre- and postmortem variables on specific mRNA levels in human brain. *Brain Res Mol Brain Res*, 11 : 37-41
- 7) Chevryeva I, Faull RL, Green CR, et al (2008) Assessing RNA quality in postmortem human brain tissue. *Exp Mol Pathol*, 84 : 71-77
- 8) Copois V, Bibeau F, Bascoul-Mollevi C, et al (2007) Impact of RNA degradation on gene expression profiles : assessment of different methods to reliably determine RNA quality. *J Biotechnol*, 127 : 549-559
- 9) Ervin JF, Heinzen EL, Cronin KD, et al (2007) Postmortem delay has minimal effect on brain RNA integrity. *J Neuropathol Exp Neurol*, 66 : 1093-1099
- 10) Halim ND, Lipska BK, Hyde TM, et al (2008) Increased lactate levels and reduced pH in post-mortem brains of schizophrenics : medication confounds. *J Neurosci Methods*, 169 : 208-213
- 11) Hardy JA, Wester P, Winblad B, et al (1985) The patients dying after long terminal phase have acidotic brains; implications for biochemical measurements on autopsy tissue. *J Neural Transm*, 61 : 253-264
- 12) Harrison PJ, Heath PR, Eastwood SL, et al (1995) The relative importance of premortem acidosis and postmortem interval for human brain gene expression studies : selective mRNA vulnerability and comparison with their encoded proteins. *Neurosci Lett*, 200 : 151-154
- 13) Hashimoto K, Sawa A, Iyo M (2007) Increased levels of glutamate in brains from patients with mood disorders. *Biol Psychiatry*, 62 : 1310-1316
- 14) Hemby SE, Ginsberg SD, Brunk B, et al (2002) Gene expression profile for schizophrenia : discrete neuron transcription patterns in the entorhinal cortex. *Arch Gen Psychiatry*, 59 : 631-640
- 15) Hynd MR, Lewohl JM, Scott HL, et al (2003) Biochemical and molecular studies using human autopsy brain tissue. *J Neurochem*, 85 : 543-562
- 16) Iwamoto K, Bundo M, Kato T (2005) Altered expression of mitochondria-related genes in post-mortem brains of patients with bipolar disorder or schizophrenia, as revealed by large-scale DNA microarray analysis. *Hum Mol Genet*, 14 : 241-253
- 17) Iwamoto K, Bundo M, Ueda J, et al (2006) Expression of ribosomal subunit genes increased coordinately with postmortem interval in human brain. *Mol Psychiatry*, 11 : 1067-1069
- 18) Kingsbury AE, Foster OJ, Nisbet AP, et al (1995) Tissue pH as an indicator of mRNA preservation in human post-mortem brain. *Brain Res Mol Brain Res*, 28 : 311-318
- 19) Li JZ, Vawter MP, Walsh DM, et al (2004) Systematic changes in gene expression in post-mortem human brains associated with tissue pH and terminal medical conditions. *Hum Mol*

- Genet, 13 : 609-616
- 20) Lipska BK, Deep-Soboslay A, Weickert CS, et al (2006) Critical factors in gene expression in postmortem human brain : Focus on studies in schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 60 : 650-658
 - 21) Miller MT, Sleight J, Rawlinson F, et al (1990) Amoxapine overdose : recovery after severe metabolic acidosis (pH 6.69) and status epilepticus. *Anaesth Intensive Care*, 18 : 246-248
 - 22) Miller P, Peers C, Kemp PJ (2004) Polymodal regulation of hTREK1 by pH, arachidonic acid, and hypoxia : physiological impact in acidosis and alkalosis. *Am J Physiol Cell Physiol*, 286 : C272-282
 - 23) Morrison-Bogorad M, Zimmerman AL, Pardue S (1995) Heat-shock 70 messenger RNA levels in human brain : correlation with agonal fever. *J Neurochem*, 64 : 235-246
 - 24) Pardue S, Zimmerman AL, Morrison-Bogorad M (1994) Selective postmortem degradation of inducible heat shock protein 70 (hsp70) mRNAs in rat brain. *Cell Mol Neurobiol*, 14 : 341-357
 - 25) Paschen W, Djuricic B, Mies G, et al (1987) Lactate and pH in the brain : association and dissociation in different pathophysiological states. *J Neurochem*, 48 : 154-159
 - 26) Popova T, Mennerich D, Weith A, et al (2008) Effect of RNA quality on transcript intensity levels in microarray analysis of human post-mortem brain tissues. *BMC Genomics*, 9 : 91
 - 27) Ravid R, Van Zwieten EJ, Swaab DF (1992) Brain banking and the human hypothalamus-factors to match for, pitfalls and potentials. *Prog Brain Res*, 93 : 83-95
 - 28) Ryan MM, Huffaker SJ, Webster MJ, et al (2004) Application and optimization of microarray technologies for human postmortem brain studies. *Biol Psychiatry*, 55 : 329-336
 - 29) Schroeder A, Mueller O, Stocker S, et al (2006) The RIN : an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol*, 7 : 3
 - 30) Spokes EG, Garrett NJ, Iversen LL (1979) Differential effects of agonal status on measurements of GABA and glutamate decarboxylase in human post-mortem brain tissue from control and Huntington's chorea subjects. *J Neurochem*, 33 : 773-778
 - 31) Stan AD, Ghose S, Gao XM, et al (2006) Human postmortem tissue : what quality markers matter? *Brain Res*, 1123 : 1-11
 - 32) Tomita H, Vawter MP, Walsh DM, et al (2004) Effect of agonal and postmortem factors on gene expression profile : quality control in microarray analyses of postmortem human brain. *Biol Psychiatry*, 55 : 346-352
 - 33) Vawter MP, Evans S, Choudary P, et al (2004) Gender-specific gene expression in post-mortem human brain : localization to sex chromosomes. *Neuropsychopharmacology*, 29 : 373-384
 - 34) Weis S, Llenos IC, Dulay JR, et al (2007) Quality control for microarray analysis of human brain samples : The impact of postmortem factors, RNA characteristics, and histopathology. *J Neurosci Methods*, 165 : 198-209
 - 35) Yates CM, Butterworth J, Tennant MC, et al (1990) Enzyme activities in relation to pH and lactate in postmortem brain in Alzheimer-type and other dementias. *J Neurochem*, 55 : 1624-1630

a) 和文および英文の論文表題

気分安定薬奏功機序解明のための包括的遺伝子発現解析

Comprehensive Gene Expression Study into the Mechanism of Action of Mood Stabilizers

b) 5つのキーワード

気分安定薬、双極性障害、遺伝子発現、マイクロアレイ、リチウム

Mood Stabilizer, Bipolar Disorder, Gene Expression, Microarray, Lithium

c) 所属機関名、著者ならびに共同研究者の日本語名およびローマ字名

d) 東北大学大学院 医学系研究科 精神・神経生物学分野

Department of Biological Psychiatry, Tohoku University Graduate School of Medicine

富田博秋 TOMITA HIROAKI

田中千秋 CHIAKI TANAKA

兪志前 YU, ZHIQIAN

小松浩 KOMATSU HIROSHI

木村好 KIMURA KONOMI

曾良一郎 SORA ICHIRO

カリフォルニア大学アーバイン校 医学部 精神医学講座

Department of Psychiatry and Human Behavior, University of California, Irvine

ヘレン B. キム KIM, HELEN B

ウィリアム E. バニー BUNNEY, WILLIAM E

はじめに

双極性障害は躁状態とうつ状態を呈する疾患で、病状が再燃、再発し易く、生涯に渡って罹患者や家族の社会生活に大きな影響を及ぼすことが多い。生涯罹患率は顕著な躁状態を呈する双極 I 型障害だけでも全人口の 0.8% 前後、軽度の躁状態の程度の軽い双極 II 型障害を含めるとその 2~3 倍にのぼると見積られる。1949 年以降の Cade、Stromgren、Schou、Baastrup 等の功績によって、リチウムイオンが抗躁作用及び再燃予防作用を持つことが確認され、双極性障害の治療薬として普及した¹⁾。一方、1980 年代以降、抗てんかん剤のうちバルプロ酸、カルバマゼピンにも同様に抗躁作用及び再燃予防作用が確認され、リチウムとあわせて気分安定薬(Mood Stabilizer)の総称で現在に至るまで、双極性障害治療の中心的な薬剤として広く用いられてきている。その後、新規の抗てんかん剤が開発される度に、気分安定薬としての有効性についても臨床治験がなされてきており、中でもラモトリジンは気分安定薬として有用性が確認され、欧米各国で広く使用されるに至っている。しかし、これまでの気分安定薬の抗躁作用、抗うつ作用の発現に時間がかかり、効果が不十分であるために、抗精神病薬、抗うつ剤なしに治療を行うことは困難なことが多い。更に再燃予防作用が不十分であったり、副作用等によるコンプライアンス低下のために、症状の再燃、再発を繰り返し、社会機能の低下を余儀なくされることも多い。より有効な双極性障害治療薬の開発が待たれるが、双極性障害の病態にも、従来の気分安定薬の奏功機序にも不明な点が多く、新規薬剤の開発を困難にしている。

これまでの気分安定薬の奏効機序に関する研究としては米国の Klein 等、Jope 等がリチウムの GSK3 ベータ抑制、バルプロ酸のヒストン修飾やリチウムの日内変動に関与する転写因子への関与など重要な研究を行っている²⁻⁴⁾。米国の Manji 等は動物実験などを通して気分安定薬の BCL2、BAG1、AMPA 遺伝子発現への影響や細胞可塑性への役割を提唱するなど活発な研究を行ってきた⁵⁻⁷⁾。また、イスラエルの Agam, Belmaker 等や英国の Harwood 等、はイノシトールリン酸系の、米国 NIA の Rapoport 等はアラキドン酸カスケードの気分安定薬の奏効機序における重要性を報告している⁸⁻¹⁰⁾。しかし、これまでの気分安定薬の奏効機序への関与が示唆されている分子がどのように奏効機序に関わっているのか、気分安定薬の奏効機序に関わるはずの多数の分子群の中でどの程度の重要性を担っているのかは不明で、今後マイクロアレイを始めとする包括的な分子遺伝学的な研究が進むことでより重要で治療法開発に有効な分子が同定されることが期待される。

マイクロアレイ法等を用いて気分安定薬による遺伝子発現変化の包括的な検討としては、これまでのところ米国の Bosetti 等、Niculescu 等、Scolnick 等、カナダの Young 等、オーストラリアの Schofield 等の複数のグループが、気分安定薬を投与したラットもしくはマウスの脳組織における発現を解析している¹¹⁻¹⁴⁾。しかし、(1) げっ歯類とヒトでは遺伝子発現の調節機構に大きな違いがある。(2) 解析に用いられる組織ブロックは神経細胞、各種グリア細胞の多種細胞種からなるため個体差や組織を切り出す過程で生じるブロックに含まれる細胞種の比率のばらつきが偽陽性を引き起こす。(3) 気分安定薬は脳内に多種存

在する神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトの各々で細胞種特異的な影響を及ぼすことが示唆されているが組織ブロックを用いた研究では細胞種特異的な影響が打ち消されて検出されない。

現在、用いられている複数の気分安定薬のヒト脳の神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトにおける遺伝子発現調節への影響を包括的に評価して、各薬剤、各細胞種に特異的な現象や、薬剤間、細胞種間に共通の現象を特定することは、気分安定薬の奏功機序を解明する上で有用と考えられる。本研究では現在、広く使用されている気分安定薬であるリチウム、バルプロ酸、カルバマゼピン、ラモトリジンの4剤をヒト脳の神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトに由来する培養細胞に投与し、遺伝子発現プロファイルへの影響をマイクロアレイ解析により検討した。

対象および方法

ヒトの神経細胞由来の培養細胞 SK-N-SH 細胞、ヒト・アストロサイト由来の UG-87 MG 細胞は American Type Culture Collection (ATCC) から購入した。ヒト・オリゴデンドロサイト由来の培養細胞 OL 細胞は Scripps 研究所の Juan Carlos De La Torre 先生のご厚意により提供を受けた。SK-N-SH 細胞および UG87 細胞は 10%ウシ胎児血清を添加した Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)、OL 細胞は 10%ウシ胎児血清を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) を用いて 37°C、5%CO₂ 濃度の CO₂ インキュベータ内で培養した。塩化リチウム、バルプロ酸、カルバマゼピン、ラモトリジンを各々の治療域濃度(0.75 mM, 0.5 mM, 50 μM, 5 μM)で混入した培養液を準備した。この際、カルバマゼピンとラモトリジンは難溶性のため一旦 Dimethyl sulfoxide (DMSO) 溶媒に溶解した上で各培養液に混入した。この際、培養液中の DMSO の最終濃度は 0.15% であったので、カルバマゼピンとラモトリジン混入溶液の対照として、溶媒である DMSO を 0.15%濃度に混入した培養液を準備した。上記、3種の培養細胞を①塩化リチウム、②バルプロ酸、③カルバマゼピン、④ラモトリジン、⑤DMSO、⑥薬物非混入の6種類の培養液中で5日間培養を行った。18種(3細胞種×6条件の薬剤投与)の細胞の各々から総 RNA を RNeasy Mini Kit (Qiagen 社, Valencia)および RNase-free DNase I (Qiagen 社, Valencia)を用いて抽出・精製し、2100 BioAnalyzer (Agilent 社, Palo Alto)にて RNA のクオリティーを確認した。500 ng の総 RNA から Illumina 社が提供するプロトコルに従ってビオチン化した cRNA を合成し、Human-6 V2 microarray (Illumina 社, San Diego) に 16 時間ハイブリダイズした後、非特異的な結合を洗浄し、専用のスキャナーで、各アレイの信号強度を測定した。各アレイのプロープの信号強度を BeadStudio 3.1 ソフトウェアで算出し、各薬剤、各細胞種に特異的に発現変化を示す遺伝子群や、薬剤間、細胞種間に共通に発現変化を示す遺伝子群を特定した。GeneSpring GX version 8.0 (Agilent 社, Palo Alto)等のソフトウェアを用いて、投与薬剤間や遺伝子間の発現プロファイルの階層クラスター等の検討を行った。また、Expression Analysis Systematic Explorer

(<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) を用いて、気分安定薬投与により顕著に発現変化を起こす遺伝子カテゴリの検討を行った。

結 果

ヒト神経細胞由来の SK-N-SH 細胞にリチウム、バルプロ酸、カルバマゼピン、ラモトリジンを投与したところ、各々 853 個、2661 個、1669 個、2570 個の遺伝子が 20% 以上発現誘導され、1701 個、2868 個、2822 個、3675 個の遺伝子が 20% 以上発現を抑制された。SK-N-SH 細胞において各投与薬剤間で共通して発現が誘導（上段）または抑制（下段）される遺伝子の数を図 1 上に示す。リチウムとバルプロ酸との間に共通して 180 個の遺伝子が誘導され、398 個の遺伝子が抑制され、カルバマゼピンとラモトリジンとの間に共通して 810 個の遺伝子が誘導され、1436 個の遺伝子が抑制された。これらの薬剤間の共通性は期待値よりも有意に高く、他の薬剤間の組み合わせではこのような高い共通性は認められなかった。4 剤に共通して 52 個の遺伝子が誘導され、174 個の遺伝子が抑制された。

ヒト・アストロサイト由来の UG-87 MG 細胞にリチウム、バルプロ酸、カルバマゼピン、ラモトリジンを投与したところ、各々 1092 個、2718 個、1659 個、2583 個の遺伝子が 20% 以上発現誘導され、1332 個、2657 個、793 個、3216 個の遺伝子が 20% 以上発現を抑制された。UG-87 MG 細胞において各投与薬剤間で共通して発現が誘導（上段）または抑制（下段）される遺伝子の数を図 1 左下に示す。リチウムとバルプロ酸との間に共通して 366 個の遺伝子が誘導され、389 個の遺伝子が抑制され、カルバマゼピンとラモトリジンとの間に共通して 577 個の遺伝子が誘導され、382 個の遺伝子が抑制された。これらの薬剤間の共通性は期待値よりも有意に高く、他の薬剤間の組み合わせではこのような高い共通性は認められなかった。4 剤に共通して 17 個の遺伝子が誘導され、33 個の遺伝子が抑制された。

ヒト・オリゴデンドロサイト由来の OL 細胞にリチウム、バルプロ酸、カルバマゼピン、ラモトリジンを投与したところ、各々 838 個、1820 個、869 個、931 個の遺伝子が 20% 以上発現誘導され、3101 個、3693 個、4051 個、3529 個の遺伝子が 20% 以上発現を抑制された。SK-N-SH 細胞において各投与薬剤間で共通して発現が誘導（上段）または抑制（下段）される遺伝子の数を図 1 右下に示す。リチウムとバルプロ酸との間に共通して 300 個の遺伝子が誘導され、1062 個の遺伝子が抑制され、カルバマゼピンとラモトリジンとの間に共通して 278 個の遺伝子が誘導され、1601 個の遺伝子が抑制された。これらの薬剤間の共通性は期待値よりも有意に高く、他の薬剤間の組み合わせではこのような高い共通性は認められなかった。4 剤に共通して 17 個の遺伝子が誘導され、208 個の遺伝子が抑制された。

3 種の細胞腫に見られるリチウムとバルプロ酸との間の高い共通性とカルバマゼピンとラモトリジンとの間の高い共通性は完全連結法による階層的クラスタリング解析によっても確認された（図 2）。図 2 のクラスタリング解析の結果は各薬剤投与につき 2 回の

培養・アレイ実験を行った繰り返し実験間で緊密な類似プロファイルを示し、その次に、リチウム投与によるプロファイル変化とバルプロ酸投与によるプロファイル変化との間と、カルバマゼピン投与によるプロファイル変化とラモトリジン投与によるプロファイル変化との間の類似性が高いことを示している。

一方、各薬剤投与により神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイト間に共通して発現が誘導、または抑制される遺伝子数を図 3 に示す。リチウム投与によってヒトの神経細胞由来の SK-N-SH 細胞、ヒト・アストロサイト由来の UG-87 MG 細胞、ヒト・オリゴデンドロサイト由来の OL 細胞に共通して 3 個の遺伝子が誘導され、41 個の遺伝子が抑制された。バルプロ酸投与では 3 種の細胞種共通に 208 個の遺伝子が誘導され、301 個の遺伝子が抑制された。カルバマゼピン投与によっては 3 種の細胞種共通に 6 個の遺伝子が誘導され、19 個の遺伝子が抑制され、ラモトリジン投与によっては 3 種の細胞種共通に 7 個の遺伝子が誘導され、89 個の遺伝子が抑制された。バルプロ酸は他の気分安定薬に比べて、細胞種間に共通して遺伝子発現に顕著に大きな影響を持っていた。

各気分安定薬投与により発現変化を受ける遺伝子群がどのような機能カテゴリ、細胞分画に属するかを Expression Analysis Systematic Explorer (EASE) で解析した結果を表 1 に示す。ヒトの神経細胞由来 SK-N-SH 細胞、ヒト・アストロサイト由来 UG-87 MG 細胞、ヒト・オリゴデンドロサイト由来 OL 細胞の全てにおいて、リチウム、バルプロ酸、カルバマゼピン、ラモトリジンの 4 剤に共通して、発現変化を受ける遺伝子群が有意に高頻度に属する遺伝子機能カテゴリ・細胞分画カテゴリにつき、各細胞、各薬剤投与により発現変化する遺伝子数の観測値の発生確率(EASE 値)を示している。表 1 の EASE 値の右側に*印を付しているカテゴリは多重比較のボンフェローニ補正法を行っても発生確率が 0.05 を切っていた。細胞外基質と連携する細胞膜蛋白で細胞外情報を細胞内に伝達すると一連の機能に関する「細胞間情報交換」「信号伝達機構の活性」「細胞外分画」「細胞外基質」「細胞膜蛋白」「細胞表面受容体関連信号伝達」などのカテゴリに属する遺伝子群が、全細胞種、全気分安定薬に共通して発現変化を受けていた。細胞機能への影響としては「形態形成」「器官形成」「発達」に関わる遺伝子、「免疫反応」に関わる遺伝子群が全細胞種、全気分安定薬に共通して発現変化を受けていた。

考 察

気分安定薬 4 剤のうちリチウムとバルプロ酸は相互に遺伝子発現プロファイルに比較的類似した及ぼし、また、カルバマゼピンとラモトリジンは相互に比較的類似した影響を及ぼしていることが観察された。リチウムとバルプロ酸は従来から脳内細胞に及ぼす影響への解明が試みてきておられ、これまでにグリコーゲン合成酵素リン酸化酵素 3 のリン酸化部位の調節を介して、酵素機能を抑制することや、イノシトールリン酸化酵素を抑制することが知られており、これらの細胞内 2 次信号伝達系の抑制を介した共通の遺伝子発現調節機構が推定される^{2, 3, 8)}。一方、カルバマゼピンとラモトリジンの細胞機能へ